

## **Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica**

**Dr. Jorge Antônio Barros de Macêdo**

www.aguaseguas.ufff.br / www.aguaseguas.hpg.com.br  
j.macedo@fbio.ufff.br / j.macedo@terra.com.br

### **1- Introdução**

Este artigo faz parte do Livro “Águas & Águas” de minha autoria, que possui vários capítulos exclusivamente dedicados à água utilizada pelas indústrias de alimentos, onde são detalhados todos os aspectos envolvidos, bem como as formas de tratamento para obtenção de uma água com características específicas ao seu uso.

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, está formado o que se denomina biofilme (COSTERTON, MARRIE, et al., 1985; ZOTTOLA, 1994).

Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície (COSTA, 1999; CARPENTIER e CERF, 1993; SURMAN, MORTON, et al., 1996).

Os biofilmes contém partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta, debaixo da qual, os microrganismos continuam crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. No biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização (PARIZI, 1998; MOSTELER e BISHOP, 1993).

A matriz de polímeros extracelulares (EPS) de natureza polissacarídea ou proteica, também conhecida como glicocálix, expõe-se exteriormente à membrana externa das células Gram negativas e ao peptídeoglicano das Gram positivas (COSTERTON, MARRIE, et al., 1985), é sintetizada pôr polimerases, constituindo-se em uma estrutura complexa bem hidratada (SURMAN, MORTON, et al., 1996).

Os biofilmes nas indústrias, em alguns casos, podem ser benéficos. Pôr exemplo, os existentes em biorreatores para a produção de fermentados. Bactérias que produzem ácido acético se agregam em fragmentos de madeira e convertem diversos substratos em vinagre. Agregados microbianos também são usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de efluentes domésticos e industriais. No processo de tratamento de água potável, a remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de trihalometanos pode ser obtida pôr biofilmes microbianos submersos (TAKASAKI, SUDO, et al., 1992).

Os microrganismos aderidos apresentam uma resistência maior à ação dos sanificantes (MOSTELLER e BISHOP, 1993; FRANK e KOFI, 1990). Os sanificantes utilizados na indústria, em testes laboratoriais dentro das condições indicadas pelos fabricantes, conseguem ser aprovados em testes como suspensão e diluição de uso, alcançando até 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C. Mas em meios de cultivos, sólidos ou líquidos não há formação de glicocalix fundamental ao processo de adesão, como será visto a seguir.

Pesquisas comprovaram que microrganismos aderidos foram entre 150 e 3000 vezes mais resistentes do que microrganismos não aderidos, à ação do ácido hipocloroso, quando da ação de monoclarinas foram de 2 a 100 vezes mais resistentes (Le CHEVALIER, BABCOCK e LEE, 1988).

Células de *L. monocytogenes* não aderidas foram eliminadas em 30 segundos de contato com o sanificante cloreto de benzalcônio, já células aderidas resistiram ao mesmo sanificante de 10 a 20 minutos (FRANK e KOFI, 1990). Outros microrganismos como *Pseudomonas fluorescens* e *Yersinia enterocolitica*, quando na presença de sanificantes como iodóforo e hipoclorito de sódio sofrem uma redução de 5 RD no teste denominado de suspensão mas, quando estes microrganismos estão aderidos em borracha, teflon, os sanificantes alcançam valores próximos de, no máximo, 3,20 RD (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

## 2- Formação do biofilme

Existem várias teorias propostas para formação de biofilmes. A primeira teoria foi descrita pôr MARSHALL, STOUT, et al., (1971), ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases, na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer pôr forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície pôr meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou proteica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocalix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocalix é produzido após o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram positivas e a parte externa da membrana externa das Gram negativas (PARIZI, 1998).

Outra teoria sugere para a formação de biofilmes, cinco etapas que didaticamente podem ser colocadas na ordem: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; ii) transportes de células e nutrientes para o sítio de aderência; iii) inicia-se o processo de adesão bacteriana, ainda reversível, pôr atração eletrostática; iv) crescimento celular, colonização e adesão irreversível; e, v) o biofilme apresenta alta atividade metabólica, liberação de células localizadas na periferia (DUDDRIDGE e PRITCHARD, 1983; CHARACKLIS e COOKSEY, 1983; CHARACKLIS, 1984).

A teoria proposta pôr NOTERMANS, DORMANS, et al. (1991), indica a formação do biofilme em três etapas: i) fixação da bactéria; ii) consolidação da bactéria na superfície; iii) a colonização e crescimento da bactéria. Na etapa de consolidação, ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos

microrganismos, nesta fase não se consegue retirar as células fixadas por rinsagem.

Vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não só da fisiologia do microrganismo mas também da natureza do substrato (SURMAN, MORTON, et al., 1996). Segundo WICKEN (1985), citado pôr COSTA (1999), as células bacterianas, possuem carga negativa e de potencial de hidrogênio (pH) em torno de 3; nas Gram positivas a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix, nas Gram negativas dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto aos polímeros do glicocálix.

### 3- Microrganismos envolvidos em processos de adesão

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e podem gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, ressaltamos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus sp* e *Enterococcus faecium* (CRIADO, SUÁREZ e FERRERÓS, 1994; ANDRADE, BRIDGEMAN e ZOTTOLA, 1998; LERICHE e CARPENTIER, 1995).

Como exemplos de patogênicos podemos citar: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (SURMAN, MORTON, et al., 1996; LERICHE e CARPENTIER, 1995; SMITH e FRATÂMICO, 1995).

LeCHEVALIER, BABCOCK, e LEE (1987) observaram em tubulações a presença de estruturas morfológicamente variadas incluindo bastões e cocos em cadeia. Além da predominância de *Arthrobacter sp*, em 20% dos isolados, que cobriam a superfícies de encanamentos, outros gêneros foram determinados, em sistemas de distribuição de água, como *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Achromobacter*.

JONES e BRADSHAW (1996), avaliaram o desenvolvimento de biofilmes pôr três membros da família *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae* cepa fixadora de nitrogênio, *Salmonella enteridis* e *Escherichia coli*, resultando contagem de  $10^6$  bactérias por  $\text{cm}^2$  nas superfícies de tubos e de vidro do reator, após 24 horas.

Para se considerar um biofilme, segundo ANDRADE, BRIDGEMAN e ZOTTOLA (1998) é necessário um número mínimo de  $10^7$  células aderidas pôr  $\text{cm}^2$ , enquanto RONNER e WONG (1993) e WIRTANEN, HUSMARK e MATTILA-SANDHOLM (1996) consideram como biofilme um número de células aderidas de  $10^5$  e  $10^3$  por  $\text{cm}^2$ , respectivamente.

Um termo que pode melhor definir os microambientes, que não se enquadram na definição clássica de biofilme, mas que apresentam risco potencial de contaminação dos alimentos é "potencial de biotransferência" (COSTA, 1999; HOOD e ZOTTOLA, 1997).

Em pesquisa realizada pôr PARIZI (1998), avaliou-se a adesão bacteriana em cupons de aço inoxidável AISI 304, polipropileno (usado na fabricação de placas para corte de carne e legumes) e policarbonato (usado na confecção de mamadeiras), os microrganismos utilizados foram a *Listeria innocua* L6a e

*Staphylococcus aureus* ATCD 6538, os resultados indicam que os microrganismos apresentam capacidade de adesão às superfícies de uso rotineiro em serviços de alimentação hospitalar, indica ainda que, esses processos de adesão quando não convenientemente controlados podem torna-se fontes de infecção hospitalar.

PARIZI (1998), ressalta ainda, que a avaliação realizada por EPF (microscopia de epifluorescência), após 10 e 12 horas, encontrou de  $10^5$  a  $10^6$  UFC /  $\text{cm}^2$ , tanto para a *Listeria innocua* quanto para *S. aureus*, independente da superfície avaliada, e que estes valores indicam um processo de adesão bacteriana e não uma formação de biofilme, entende-se que, para ser considerado um biofilme, o número de células aderidas deve estar entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC /  $\text{cm}^2$ , como já citado anteriormente, ou seja, entre 10 a 100 vezes acima dos valores encontrados neste experimento.

Pesquisa de importância foi realizada por COSTA (1999), que utilizando carreadores de aço inox (tipo 304, nº 4), mostrou que *Pseudomonas fluorescens*, com apenas 8 horas de contato, atinge valores na ordem de  $10^5$  UFC /  $\text{cm}^2$  na superfície dos carreadores.

Outro aspecto importante se refere ao fato que as células num biofilme podem entrar em um estado de vida, nestas condições as células são viáveis mas não culturáveis (VBNC – viable-but-non-culturable). O que significa dizer que elas não irão crescer num meio de cultura normalmente utilizado para sua detecção. Ressalta-se a necessidade de estabelecer procedimentos de higienização corretos, ou seja, um “Procedimento Operacional Padrão de Higiene (SSOP’s – Sanitizing Standard Operating Procedures) (ARCURI, 2000).

#### 4- Métodos de avaliação de biofilmes

Os métodos podem ser divididos em dois grupos, os métodos visuais e métodos não visuais.

Como métodos visuais citamos a microscopia de contraste, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

A microscopia de contraste é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, numa superfície transparente. A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa excelente na quantificação de células aderidas às superfícies. Para visualizar a adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para coloração direta das células, ou anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação (COSTA, 1999).

Com o uso do corante alaranjado de acridina, as bactérias que são viáveis fluorescem de laranja e as que fluorescem de verde são inviáveis, logo, no processo de contagem se consideram apenas as células que fluorescem laranja ou laranja avermelhado.

A microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é realizada utilizando agentes químicos, como glutaraldéido, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-

fixadas, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (COSTA, 1999).

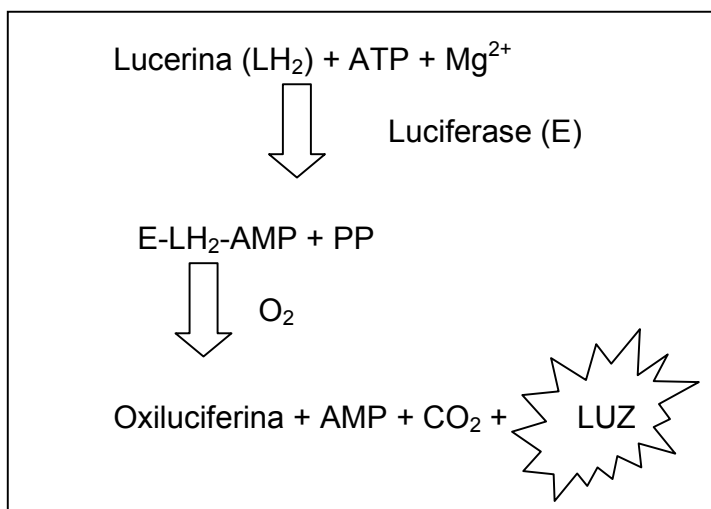
Os métodos não visuais aplicados à avaliação de aderência bacteriana e formação biofilmes são as medidas da impedância e de bioluminescência.

A medida de impedância se baseia no princípio de que, ao se metabolizarem os componentes presentes num meio de cultura, os microrganismos transformam moléculas grandes em pequenas que possuem cargas elétricas, o que leva a uma mudança da resistência ou impedância do meio, a mudança da condutividade pode ser medida, e o número de microrganismos aderidos à superfície está relacionado com o valor obtido para a condutividade (RULE, 1997; SILEY e FORSYTHE, 1996).

A técnica de bioluminescência se baseia no conteúdo de ATP, trifosfato de adenosina, que é considerada a moeda universal de energia nos sistemas biológicos e é gerado de modo semelhante pôr todas as formas de vida na célula bacteriana. O ATP é gerado pela oxidação de moléculas alimentares, tais como glicose, ácidos graxos e aminoácidos.

A quantidade de ATP em uma amostra pode ser medida pôr uma reação de bioluminescência entre a luciferina e a enzima luciferase (FRANCO e LANDGRAF, 1996), cuja esquema de reação é representado na Figura 9.

A quantidade de luz emitida pode ser medida pôr um luminômetro, um fluorímetro ou um espectrofotômetro de cintilação líquida. Na área de alimentos, a contagem de microrganismos viáveis pôr essa técnica sofre interferência do ATP intrínseco, ou seja, aquele presente em outras células. Alimentos como carne fresca, leite e pescado tem grande quantidade de ATP não microbiano, sendo necessário que esse ATP seja eliminado, para utilização do método, em geral, utiliza-se a substância química "apirase", extraída de batata, que possui a capacidade de hidrolisar o ATP extracelular, sem interferir no ATP microbiano, que é intracelular (FRANCO e LANDGRAF, 1996).



Fonte: Adaptado de FRANCO e LANDGRAF, 1996.

ATP = Trifosfato de adenosina

AMP = Monofosfato de adenosina

PP = Pirofosfato

E-LH<sub>2</sub>-AMP =Complexo luciferase-luciferina-AMP

FIGURA 9- Esquema representativo da formação de luz na reação de bioluminescência.

## 5- Bibliografia

ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A., Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

ANDRADE e MACÊDO, **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 180p., 1996.

ARCURI, E. F., Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**. v.9, n.53, p.40-45, 2000.

CARPENTIER, B., CERF, O., Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.499-511, 1993.

CHARACKLIS, W. G., Biofilm development: A process analysis. In **Microbial Adhesion and Aggregation**. Ed. K. C. Marshall, Spriger Verlag, New York, 1984.

CHARACKLI, W. G., COOKSEY, K. E., Biofilm and microbial fouling. **Adv. Applied Microbiology**, v.29, p.93-137, 1983.

COSTA, E. T. R., **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. Seropédica, RJ. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

COSTERTON, J. W., MARRIE, T. J., CHENG, K. J., Phenomena of bacterial adhesion. In: **Bacterial Adhesion**. Savage, D.C., Fletcher, M (Ed.) London: Plenum Press, p.3-43, 1985.

COSTERTON, J. W., CHENG, K. G., GEESEY, K. G., LADD, P. I., NICKEL, J. C., DASCUPAM, M., MARRIE, T. J. **Bacterial biofilms in nature disease**. Annual Reviews in Microbiology, v.41, p.435-464, 1987.

CRIADO, M. T., SUÁREZ, B., FERRERÓS, C. M., The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

DUDDRIDGE, J. E., PRITCHARD, A. M., Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. **Proceeding of the Conference on Microbial Corrosion**. Teddington: p.28-35, 1983.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M., **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 182p., 1996.

FRANK, J. H., KOFI, R., A surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, v.53, n.7, p.550-554, 1990.

HOOD, S. K., ZOTTOLA, E. A., Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v.60, n.9, p.1034-1037, 1997.

JONES, K., BRADSHAW, S. B., Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: a comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, p.458-464, 1996.

Revista Fármacos & Medicamentos, V.2, n.7, Nov/Dez de 2000, p.19-24.

www.aguaseguas.ufff.br / www.aguaseguas.hpg.com.br

jmacedo@fbio.ufff.br / j.macedo@terra.com.br

LeCHEVALIER, M. W., BABCOCK, T. M., LEE, R. G., Examination and characterization of distribution system biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.12, p.2714-2724, 1987.

LeCHEVALIER, M. W., CAWTHON, C. D., LEE, R. G., Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.3, 649-654, 1988.

LERICHE, V., CARPENTIER, B., Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single and binary biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v.58, p.1186-1191, 1995.

MACÊDO, J. A. B., **Águas & Águas**. Belo Horizonte: ORTOFARMA, 505p., 2000.

MARSHALL, K. C., STOUT, R., MITCHELL, R., Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**, v.68, p.337-348, 1971.

MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R., Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

NORTERMANS, S., DORMANS, J. A. M. A., MEAD, G. C., Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, v.5, p.1-16, 1991.

PARIZZI, S. Q. F., **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. Viçosa, MG: UFV, 1998, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

WIRTANEN, G., HUSMARK, U., MATTILA-SANDHOLM, T., Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

RONNER, A. B., WONG, A. C. L., Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

RULE, P. Measurement of microbial activity by impedance. In: TORTORELLO, M. L. e GENDEL, S. M., **Food Microbiological Analysis**: New Technologies. IFT basica symposium series. Cap. 16, p.315-343, 1997.

SILEY, P., FORSYTHE, S. A., A review: Impedance microbiology—a rapid change for microbiologist. **Journal Applied Bacteriology**, v.80, p.233-243, 1996.

Revista Fármacos & Medicamentos, V.2, n.7, Nov/Dez de 2000, p.19-24.

www..aguaseguas.ufff.br / www.aguaseguas.hpg.com.br

jmacedo@fbio.ufff.br / j.macedo@terra.com.br

SMITH, J. L., FRATÂMICO, P. M., Factores involved in the emergence and persistente of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.696-708, 1995.

SURMAN, S., MORTON, G., KEEVIL, B., Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest**, v. 13, n.1, p.33-38, 1996.

TAKASAKI, M., SUDO, R., NISHIMURA, O., KIM, H. Y., Simultaneous removal of nitrogen am THM precursor by developed submergerd biofilm process for drinking water. **Water Scientiae Technology**, v.26, n.9-11, p.2021-2024, 1992 (CAB Abstracts).

ZOTTOLA, E. A., Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry ? **Food Technology**, v.48, n.7, p.107-114, 1994.

#### **Dr. Jorge Antônio Barros de Macêdo**

Bacharel em Química Tecnológica, Especialista em análise de traços e química ambiental, Magister and Doctor Scientiae and Technology of Food. Professor Convidado do Departamento Farmacêutico da FFB/UFFJ e Diretor Científico da ORTOFARMA – Laboratório de Controle da Qualidade Ltda.